

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



15 JUL 2004

(43) Date de la publication internationale  
21 août 2003 (21.08.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 03/068787 A1

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
C07F 17/02, 17/00, C07K 2/00,  
C07H 23/00, C12Q 1/68, G01N 33/52

(30) Données relatives à la priorité :  
02/01858 14 février 2002 (14.02.2002) FR

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR03/00484

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :  
BIOMERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280  
Marcy l'Etoile (FR).

(22) Date de dépôt international :  
14 février 2003 (14.02.2003)

(72) Inventeurs; et  
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :  
CHAIX-BAUVAIS, Carole [FR/FR]; Chemin de  
Tholomé, F-69970 Chaponnay (FR). MOUSTROU,  
Corinne [FR/FR]; 99, square des Frères Ambrogiani, Bât.  
B Eastern Prado, F-13008 Marseille (FR). NAVARRO,  
Aude-Emmanuelle [FR/FR]; 26, rue Pierre Laurent,

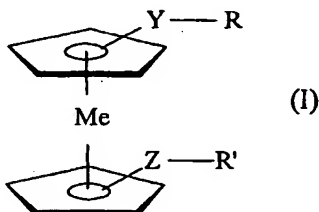
(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: BI-FUNCTIONALISED METALLOCENES USE FOR MARKING BIOLOGICAL MOLECULES

(54) Titre : METALLOCENES BIFONCTIONNALISÉS, UTILISATION POUR LE MARQUAGE DE MOLECULES BIOLOGIQUES



(57) Abstract: The invention relates to bi-functionalised metallocenes of general formula (I) where Me = a transition metal, preferably chosen from Fe, Ru and Os, Y and Z, when identical are selected from  $-(CH_2)_n-O-$ ,  $(CH_2)_2-O-[(CH_2)_2-O]_p-$  and  $-(CH_2)_q-CONH-(CH_2)_r-O-$ , or Y =  $-(CH_2)_s-NH-$  and Z =  $-(CH_2)_t-COO-$ , n = a whole number from 3 to 6 inclusive, p = a whole number from 1 to 4 inclusive, q = a whole number from 0 to 2 inclusive, r = a whole number from 0 to 2 inclusive, s = a whole number from 2 to 5 inclusive, t = a whole number from 3 to 6 inclusive, R and R' = H atoms or are protective groups used in oligonucleotide and peptide synthesis, where at least one of R or R' is a protective group used in oligonucleotide and peptide synthesis and R and R' are as defined below: (i) when Z and Y are selected from  $(CH_2)_n-O-$ ,  $-(CH_2)_2-O-[(CH_2)_2-O]_p-$  and  $-(CH_2)_q-CONH-(CH_2)_r-O-$ , then R and R' are protective groups used in oligonucleotide synthesis and R is a group which can leave a free OH group after deprotection, preferably a photolabile group such as monomethoxytrityl, dimethoxytrityl, *t*-butyldimethylsilyl, acetyl or trifluoroacetyl, and R' is a phosphorylated group which can react with a free OH, preferably a phosphodiester, phosphoramidite or H-phosphonate and (ii) when Y =  $-(CH_2)_s-NH-$  and Z =  $-(CH_2)_t-COO-$ , then R is a protective group used in the synthesis of peptides and is an amino-protecting group, preferably 9-fluorenyloxycarbonyl, *t*-butoxycarbonyl or benzyloxycarbonyl and R' = H. The above is applied in marking.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet des métallocènes bifonctionnalisés de Formule générale (I) dans laquelle Me représente un métal de transition, de préférence choisi parmi Fe, Ru et Os, Y et Z, identiques, sont choisis parmi  $-(CH_2)_n-O-$ ,  $(CH_2)_2-O-[(CH_2)_2-O]_p-$  et  $-(CH_2)_q-CONH-(CH_2)_r-O-$ , ou bien Y est  $-(CH_2)_s-NH-$  et Z est  $-(CH_2)_t-COO-$ , n est un nombre entier compris entre 3 et 6, p est un nombre entier compris entre 1 et 4, q est un nombre entier compris entre 0 et 2, r est un nombre entier compris entre 0 et 2, s est un nombre entier compris entre 2 et 5, t est un nombre entier compris entre 3 et 6, R et R' représentent des atomes d'hydrogène ou sont des groupements protecteurs utilisés dans la synthèse des oligonucléotides et des peptides, étant entendu que l'un au moins de R ou R' est un groupement protecteur utilisé dans la synthèse des oligonucléotides et des peptides et que R et R' sont tels que définis ci-après : (i) lorsque Z et Y sont choisis parmi  $-(CH_2)_n-O-$ ,  $-(CH_2)_2-O-[(CH_2)_2-O]_p-$  et  $-(CH_2)_q-CONH-(CH_2)_r-O-$ , alors R et R' sont des groupements protecteurs utilisés dans la synthèse des oligonucléotides, et R est un groupement susceptible de laisser un groupement hydroxyle libre après déprotection, de préférence un groupement photolabile, le monométhoxytrityle, le diméthoxytrityle, le *ter*-butyldiméthylsilyle, l'acétyle ou le trifluoroacétyle, et R' est un groupement phosphoré susceptible de réagir avec un groupement hydroxyle libre, de préférence un groupement phosphodiester, phosphoramidite ou H-phosphonate et (ii) lorsque Y est  $-(CH_2)_s-NH-$  et Z est  $-(CH_2)_t-COO-$ , alors R est un groupement protecteur utilisé dans la synthèse des peptides et représente un groupement protecteur des amines, de préférence le 9-fluorényloxycarbonyl, le *tert*-butoxycarbonyl ou le benzyloxycarbonyl, et R' représente un atome d'hydrogène.

WO 03/068787 A1

BEST AVAILABLE COPY



F-13006 Marseille (FR). **BRISSET, Hugues** [FR/FR]; 179, allée Sainte-Lucie, Le Plan de la Mer, F-83270 Saint Cyr sur Mer (FR). **GARNIER, Francis** [FR/FR]; 17, Villa Rémy, F-94500 Champigny sur Marne (FR). **MANDRAND, Bernard** [FR/FR]; 21, rue de la Doua, F-69100 Villeurbanne (FR). **SPINELLI, Nicolas** [FR/FR]; Résidence Louise Labe, Apt. 206, 11, rue Montesquieu, F-69007 Lyon (FR).

(74) Mandataire : **CABINET GERMAIN & MAUREAU**; Boîte postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

**METALLOCENES BIFONCTIONNALISES, PROCEDE D'OBTENTION,  
UTILISATION POUR LE MARQUAGE DE MOLECULES BIOLOGIQUES**

La présente invention concerne le domaine du marquage, notamment de  
5 molécules biologiques d'intérêt telles que les oligonucléotides et les peptides. Plus  
particulièrement, l'invention a pour objet de nouveaux métallocènes bifonctionnalisés,  
leur procédé d'obtention, leur utilisation pour le marquage d'oligonucléotides ou de  
peptides, les oligonucléotides et peptides marqués ainsi obtenus, ainsi qu'un support  
pour la synthèse supportée, fonctionnalisé par au moins un métallocène de l'invention.

10 Les métallocènes sont connus en tant que marqueurs d'oligonucléotides  
notamment pour la détection de fragments d'ADN ou d'ARN.

Ainsi, par exemple, le brevet US 6,211,356 décrit l'utilisation d'un  
métallocène monofonctionnel présentant la fonction phosphoramidite pour conférer,  
après couplage, un signal à de l'ADN et/ou de l'ARN qui sera alors détectable à l'aide  
15 d'un microscope électronique. L'addition du métallocène à l'oligonucléotide est  
effectuée de façon manuelle et uniquement en bout de chaîne.

La demande de brevet US 6,232,062 décrit des conjugués oligonucléotide-  
ferrocène en tant que sonde électrochimique pour détecter une hybridation. Lesdits  
conjugués sont obtenus par synthèse supportée à partir d'une uridine modifiée par un  
20 ferrocène et utilisée comme synthon. Les deux synthons décrits sont une uridine 3'-  
phosphoramidite ayant un ferrocène en position 5 et une uridine 3'-phosphoramidite  
ayant un ferrocène en position 2'. La production d'oligonucléotides marqués par un  
ferrocène à l'aide de cette technique a pour inconvénient un coût élevé du fait de  
l'utilisation d'un nucléoside modifié par un ferrocène comme synthon (monomère  
25 compatible avec la synthèse) dont l'élaboration est complexe.

On connaît de C.J. Yu et al. (J. Org. Chem., 2001, 66, 2937-2942) des  
phosphoramidites modifiées chimiquement comportant un substituant ferrocène en  
position 2' du ribose. Ces phosphoramidites permettent de synthétiser des  
oligonucléotides comportant des ferrocènes à diverses positions, mais les synthèses de  
30 ces phosphoramidites font appel à des techniques de synthèse avec protection et  
déprotection des fonctions amines de l'hétérocycle et des autres fonctions OH libres et

nécessitent de procéder dans des conditions permettant de conserver la sélectivité de la substitution.

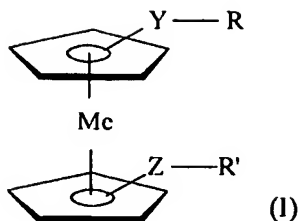
Les demandes de brevet WO 00/31750 et WO 01/81446 décrivent des ferrocènes bifonctionnalisés à titre de sonde électrochimique observable, lesquels  
5 ferrocènes sont greffés à un polypyrrole d'une part et à un oligonucléotide d'autre part. Le couplage du ferrocène à l'oligonucléotide est réalisé entre l'ester activé (N-hydroxy-phtalimide) du ferrocène et la terminaison  $\text{NH}_2$  de l'oligonucléotide déjà synthétisé. Ce couplage a pour inconvénients qu'il n'est pas compatible avec la synthèse automatisée des oligonucléotides et qu'il manque de sélectivité (réactions parasites sur les amines  
10 des bases).

La synthèse supportée de conjugués métallocène/oligonucléotide ou métallocène/peptide avec les métallocènes utilisés dans l'art antérieur est fastidieuse car elle nécessite la synthèse d'un nucléoside modifié par un ferrocène, puis du synthon phosphoramidite correspondant. Par ailleurs, le couplage de métallocène sur des  
15 oligonucléotides ou des peptides n'est pas toujours sélectif de sorte qu'il ne peut pas être automatisé sur les synthétiseurs actuels du commerce.

La demanderesse a maintenant découvert de nouveaux métallocènes bifonctionnalisés qui permettent de palier les inconvénients dus aux métallocènes de l'art antérieur, à savoir qu'ils permettent :

- 20 - une synthèse automatisée des conjugués métallocène/oligonucléotide ou métallocène/peptide,
- un couplage sélectif entre le métallocène et l'oligonucléotide ou le métallocène et le peptide et
- une amélioration des coûts de production desdits conjugués car le synthon utilisé est le  
25 métallocène en tant que tel et non sous forme de nucléoside modifié par un métallocène.

Ainsi, la présente invention a pour objet des métallocènes de formule (I) :



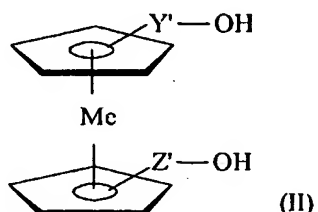
dans laquelle

- Me représente un métal de transition, de préférence choisi parmi Fe, Ru et Os,
- Y et Z, identiques, sont choisis parmi  $-(CH_2)_n-O-$ ,  $-(CH_2)-O-[(CH_2)_2-O]_p-$  et  $-(CH_2)_q-$
- 5  $CONH-(CH_2)_r-O-$ , ou bien
- Y est  $-(CH_2)_s-NH-$  et Z est  $-(CH_2)_t-COO-$ ,
- n est un nombre entier compris entre 3 et 6,
- p est un nombre entier compris entre 1 et 4,
- q est un nombre entier compris entre 0 et 2
- 10 - r est un nombre entier compris entre 0 et 2,
- s est un nombre entier compris entre 2 et 5,
- t est un nombre entier compris entre 3 et 6,
- R et R' représentent des atomes d'hydrogène ou sont des groupements protecteurs utilisés dans la synthèse des oligonucléotides et des peptides et sont tels que définis ci-après :
- 15 (i) lorsque Z et Y sont choisis parmi  $-(CH_2)_n-O-$ ,  $-(CH_2)-O-[(CH_2)_2-O]_p-$  et  $-(CH_2)_q-CONH-(CH_2)_r-O-$ , R est un groupement susceptible de laisser un groupement hydroxyle libre après déprotection, de préférence un groupement photolabile, le monométhoxytrityle, le diméthoxytrityle, le *tert*-butyldiméthylsilyle, l'acétyle ou le trifluoroacétyle, et R' est un groupement phosphoré susceptible de réagir avec un
- 20 groupement hydroxyle libre, de préférence un groupement phosphodiester, phosphoramidite ou H-phosphonate et
- (ii) lorsque Y est  $-(CH_2)_s-NH-$  et Z est  $-(CH_2)_t-COO-$ , R représente un groupement protecteur des amines, de préférence le 9-fluorényloxycarbonyle, le *tert*-butoxycarbonyle ou le benzyloxycarbonyle, et R' représente un atome d'hydrogène.
- 25 Un autre objet de l'invention consiste en un procédé de préparation d'un métallocène de l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

(i) lorsque Z et Y sont choisis parmi  $-(CH_2)_n-O-$ ,  $-(CH_2)-O-[(CH_2)_2-O]_p-$  et  $-(CH_2)_q-CONH-(CH_2)_r-O-$  :

- une étape de protection d'un des groupements hydroxyle d'un composé de formule générale (II) :

5



dans laquelle Me est tel que défini précédemment,

Y' et Z', identiques, sont choisis parmi  $-(CH_2)_n-$ ,  $-(CH_2)-O-[(CH_2)_2-O]_p-(CH_2)_2-$  et  $-(CH_2)_q-CONH-(CH_2)_r-$ , n, q et r sont tels que définis précédemment, et p' est un nombre entier compris entre 0 et 3,

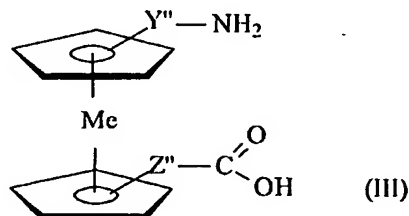
par fixation d'un groupement susceptible de laisser un groupement hydroxyle libre après déprotection, de préférence choisi parmi un groupement photolabile, le monométhoxytrityle, le diméthoxytrityle, le *tert*-butyldiméthylsilyle, l'acétyle et le trifluoroacétyle, et

- une étape de condensation, sur l'autre groupement hydroxyle laissé libre, d'un groupement phosphoré susceptible de réagir avec un groupement hydroxyle libre, de préférence choisi parmi les groupements phosphodiester, phosphoramidite et H-phosphonate ; et

(ii) lorsque Y est  $-(CH_2)_5-NH-$  et Z est  $-(CH_2)_t-COO-$  :

- une étape de protection du groupement  $NH_2$  d'un composé de formule générale

(III) :



dans laquelle

- Me est tel que défini précédemment,

- Y'' est  $-(CH_2)_s-$  et

5 - Z'' est  $-(CH_2)_t-$ ,

- s et t étant tels que définis précédemment,

par fixation d'un groupement susceptible de laisser une fonction amine libre après déprotection, de préférence choisi parmi le 9-fluorényloxycarbonyl, le *tert*-butoxycarbonyl et le benzyloxycarbonyl.

10 Un autre objet de l'invention consiste en un (bis)hydroxymétallocène de formule générale (II) telle que décrite ci-dessus.

Un autre objet de l'invention consiste en un procédé de marquage :

- d'un oligonucléotide par un métallocène bifonctionnalisé de formule (I), dans laquelle Y et Z, identiques, sont choisis parmi  $-(CH_2)_n-O-$ ,  $-(CH_2)-O-[(CH_2)_2-O]_p-$  et  $-(CH_2)_q-$

15  $CONH-(CH_2)_r-O-$ , comprenant la substitution d'un ou plusieurs synthons de nucléotides par un ou plusieurs desdits métallocènes de formule (I) dans le cycle de synthèse dudit oligonucléotide, et

- d'un peptide par un métallocène bifonctionnalisé de formule (I), dans laquelle Y est  $-(CH_2)_s-NH-$  et Z est  $-(CH_2)_t-COO-$ , comprenant la substitution d'un ou plusieurs

20 synthons d'acides aminés par un ou plusieurs desdits métallocènes de formule (I) dans le cycle de synthèse dudit peptide,

ainsi que les oligonucléotides et les peptides ainsi marqués.

Un autre objet de l'invention consiste en un support de synthèse d'oligonucléotides ou de peptides, fonctionnalisé en surface par au moins un

25 métallocène de formule (I) de l'invention, respectivement.

Avant de détailler l'invention, on définit ci-après certains termes utilisés dans la description et les revendications.

Le terme « oligonucléotide » désigne un enchaînement d'au moins 2 nucléotides (désoxyribonucléotides ou ribonucléotides, ou les deux), naturels ou  
30 modifiés, susceptibles de s'hybrider, dans des conditions appropriées d'hybridation, avec un oligonucléotide au moins partiellement complémentaire. Par nucléoside, on

entend un composé organique consistant en une base purine ou pyrimidine liée à un ose (ribose ou deoxyribose). Par nucléotide, on entend un composé organique consistant en une base purine ou pyrimidine liée à un ose (ribose ou deoxyribose) et à un groupe phosphate. Par nucléotide modifié, on entend par exemple un nucléotide comportant  
5 une base modifiée et/ou comportant une modification au niveau de la liaison internucléotidique et/ou au niveau du squelette. A titre d'exemple de base modifiée, on peut citer l'inosine, la méthyl-5-désoxycytidine, la diméthylamino-5-désoxyuridine, la diamino-2,6-purine et la bromo-5-désoxyuridine. Pour illustrer une liaison internucléotidique modifiée, on peut mentionner les liaisons phosphorothioate, N-  
10 alkylphosphoramidate, alkylphosphonate et alkylphosphotriester. Les alpha-oligonucléotides tels que ceux décrits dans FR-A-2 607 507 et les PNA qui font l'objet de l'article de M. Egholm et al., J. Am. Chem. Soc. (1992), 114, 1895-1897, sont des exemples d'oligonucléotides constitués de nucléotides dont le squelette est modifié.

Le terme « peptide » signifie notamment tout enchaînement d'au moins  
15 deux acides aminés, tels que protéine, fragment de protéine, oligopeptide qui a été extrait, séparé, isolé ou synthétisé, comme un peptide obtenu par synthèse chimique ou par expression dans un organisme recombinant. Sont inclus aussi tous les peptides dans la séquence desquels un ou plusieurs acides aminés de la série L sont remplacés par un ou plusieurs acides aminés de la série D, et vice-versa ; tout peptide dont l'une au  
20 moins des liaisons CO-NH est remplacée par une liaison NH-CO ; tout peptide dont l'une au moins des liaisons CO-NH est remplacée par une liaison NH-CO, la chiralité de chaque résidu aminoacyle, qu'il soit impliqué ou non dans une ou plusieurs desdites liaisons CO-NH, étant soit conservée, soit inversée par rapport aux résidus aminoacyle constituant un peptide de référence (ou immunorétoïdes) ; et tout mimotope.

25 Pour illustrer les diverses classes des peptides concernés, on peut mentionner les hormones adrénocorticotropiques ou leurs fragments, les analogues d'angiotensine et leurs inhibiteurs, les peptides natriurétiques, la bradykinine et ses dérivés peptidiques, les peptides chimiotactiques, la dynorphine et ses dérivés, les endorphines et leurs dérivés, les encéphalines et leurs dérivés, les inhibiteurs d'enzyme,  
30 les fragments de fibronectine et leurs dérivés, les peptides gastrointestinaux, les



peptides opioïdes, l'oxytocine, la vasopressine, la vasotocine et leurs dérivés, les protéines kinase.

Les métallocènes de l'invention sont utiles en tant que synthon pour la préparation de dérivés d'haptènes ou toutes autres molécules qui peuvent être synthétisées.

En particulier, les métallocènes de l'invention sont utiles dans la synthèse supportée des oligonucléotides et des peptides. Ils permettent le marquage d'oligonucléotides ou de peptides synthétisés de façon très sélective du fait des deux fonctions particulières qu'ils possèdent, à savoir deux fonctions hydroxyle telles que montrées dans la formule (II) pour la synthèse supportée des oligonucléotides, ou bien une fonction amine et une fonction acide telles que montrées dans la formule (III) pour la synthèse supportée des peptides.

Dans le cas de la synthèse supportée des oligonucléotides, les bras espaceurs fonctionnalisés Y et Z tels qu'indiqués dans la formule (I) possèdent chacun une fonction oxy donnant une fonction hydroxyle après déprotection et Y et Z sont choisis parmi  $-(CH_2)_n-O-$ ,  $-(CH_2)-O-[(CH_2)_2-O]_p-$  et  $-(CH_2)_q-CONH-(CH_2)_r-O-$ .

Selon un mode de réalisation de l'invention, Y et Z sont chacun  $-(CH_2)_n-O-$ , n étant égal à 3.

Selon un autre mode de réalisation, Y et Z sont chacun  $-(CH_2)-O-[(CH_2)_2-O]_p-$ , p étant égal à 2.

Dans le cas de la synthèse supportée des peptides, les bras espaceurs fonctionnalisés Y et Z tels qu'indiqués dans la formule (I) possèdent soit une fonction amide donnant une fonction amine après déprotection, soit une fonction acide et sont choisis parmi  $-(CH_2)_s-NH-$  et  $-(CH_2)_t-COO-$ , étant entendu que Y et Z ne peuvent pas être identiques.

Selon un mode de réalisation de l'invention, s est égal à 3 et t est égal à 4.

Le métal de transition Me utilisé dans les métallocènes de formule (I) de l'invention peut être tout métal de transition. De préférence, il est choisi parmi Fe, Ru et Os.

Selon un mode de réalisation de l'invention, Me est le fer.

Les groupements protecteurs utilisés dans la synthèse des oligonucléotides et des peptides sont tout groupement classiquement connu de l'homme du métier. Ils sont décrits par exemple dans *Solid Phase Synthesis, A practical Guide*, Steven A. Kates, Fernando Albericio, Ed Maral Dekker, 2000.

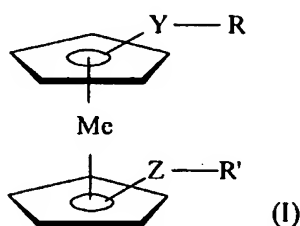
5 Dans le cas d'un métallocène de l'invention utile comme synthon dans la synthèse des oligonucléotides, l'un des groupements protecteurs doit être un groupement phosphoré capable de réagir soit avec un hydroxyle libre en 5' ou en 3' du nucléotide précédent dans la mesure où le métallocène de l'invention est placé après un nucléotide, soit avec un hydroxyle déprotégé du métallocène précédent dans la mesure  
10 où l'oligonucléotide comporte plusieurs métallocènes à la suite, soit avec un hydroxyle libre d'un autre composé chimique pouvant servir par exemple de bras espaceur, tel que le poly(oxyde d'éthylène). Les exemples de tels groupements protecteurs phosphorés comprennent les groupements phosphodiester, phosphoramidite et H-phosphonate, ainsi que leurs dérivés.

15 L'autre groupement protecteur du métallocène doit être capable de laisser un groupement hydroxyle libre après déprotection pour réagir soit avec un phosphore réactif (phosphodiester, phosphoramidite, H-phosphonate) du nucléotide suivant dans la mesure où le métallocène est placé avant un nucléotide, soit avec un phosphore réactif du métallocène suivant dans la mesure où au moins deux métallocènes se suivent. A  
20 titre d'exemple de ce type de groupement protecteur, on peut citer les groupements photolabiles, le monométhoxytrityle, le diméthoxytrityle, le *tert*-butyldiméthylsilyle, l'acétyle et le trifluoroacétyle.

A titre d'exemples de groupement photolabile, on peut citer le 6-nitrovératryle, le 6-nitropipéronyle, le méthyl-6-nitrovératryle, le nitrovératrylcarbonyle,  
25 le méthyl-6-nitropipéronyle, le nitrobenzyle, le nitrobenzyloxycarbonyle, le diméthyldiméthoxybenzyle, le diméthyldiméthoxybenzyloxycarbonyle, le 5-bromo-7-nitroindolyle, l'hydroxy- $\alpha$ -méthylcinnamoyle, le 2-oxyméthylène anthraquinone, le pirénylméthoxycarbonyle.

Des exemples de groupement protecteur des amines comprennent le 9-  
30 fluorényloxycarbonyle, le *tert*-butoxycarbonyle et le benzyloxycarbonyle.

Un métallocène bifonctionnalisé de formule générale (I) :



dans laquelle

- 5 - Me représente un métal de transition, de préférence choisi parmi Fe, Ru et Os,
- Y et Z, identiques, sont choisis parmi  $-(CH_2)_n-O-$ ,  $-(CH_2)-O-[(CH_2)_2-O]_p-$  et  $-(CH_2)_q-CONH-(CH_2)_r-O-$ , ou bien
- Y est  $-(CH_2)_s-NH-$  et Z est  $-(CH_2)_t-COO-$ ,
- n est un nombre entier compris entre 3 et 6,
- 10 - p est un nombre entier compris entre 1 et 4,
- q est un nombre entier compris entre 0 et 2
- r est un nombre entier compris entre 0 et 2,
- s est un nombre entier compris entre 2 et 5,
- t est un nombre entier compris entre 3 et 6,
- 15 - R et R' représentent des atomes d'hydrogène ou sont des groupements protecteurs utilisés dans la synthèse des oligonucléotides et des peptides, étant entendu que l'un au moins de R ou R' est un groupement protecteur utilisé dans la synthèse des oligonucléotides et des peptides et que R et R' sont tels que définis ci-après :
  - (i) lorsque Z et Y sont choisis parmi  $-(CH_2)_n-O-$ ,  $-(CH_2)-O-[(CH_2)_2-O]_p-$  et
  - 20  $-(CH_2)_q-CONH-(CH_2)_r-O-$ , alors R et R' sont des groupements protecteurs utilisés dans la synthèse des oligonucléotides, et R est un groupement susceptible de laisser un groupement hydroxyle libre après déprotection, de préférence un groupement photolabile, le monométhoxytrityle, le diméthoxytrityle, le *tert*-butyldiméthylsilyle, l'acétyle ou le trifluoroacétyle, et R' est un groupement phosphoré susceptible de réagir
  - 25 avec un groupement hydroxyle libre, de préférence un groupement phosphodiester, phosphoramidite ou H-phosphonate et

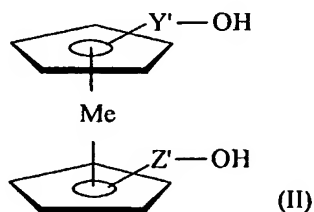
- (ii) lorsque Y est  $-(CH_2)_5-NH-$  et Z est  $-(CH_2)_r-COO-$ , alors R est un groupement protecteur utilisé dans la synthèse des peptides et représente un groupement protecteur des amines, de préférence le 9-fluorényloxycarbonyl, le *tert*-butoxycarbonyl ou le benzyloxycarbonyl, et R' représente un atome d'hydrogène, constitue un objet préféré de l'invention.

Les métallocènes de l'invention sont préparés par un procédé nécessitant une ou deux étapes permettant d'obtenir les groupements protecteurs souhaités sur les bras espaceurs fonctionnalisés appropriés.

- 10 Ainsi, la présente invention a également pour objet un procédé de préparation d'un métallocène de l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

(i) lorsque Z et Y sont choisis parmi  $-(CH_2)_n-O-$ ,  $-(CH_2)-O-[(CH_2)_2-O]_p-$  et  $-(CH_2)_q-CONH-(CH_2)_r-O-$  :

- 15 - une étape de protection d'un des groupements hydroxyle d'un composé de formule générale (II) :



dans laquelle Me est tel que défini précédemment,

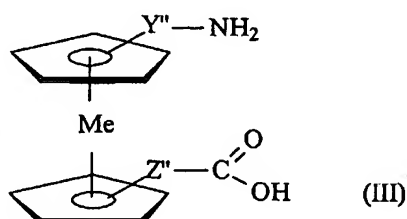
- 20 Y' et Z', identiques, sont choisis parmi  $-(CH_2)_n-$ ,  $-(CH_2)-O-[(CH_2)_2-O]_p-(CH_2)_2-$  et  $-(CH_2)_q-CONH-(CH_2)_r-$ , n, q et r sont tels que définis précédemment, et p' est un nombre entier compris entre 0 et 3,
- par fixation d'un groupement susceptible de laisser un groupement hydroxyle libre après déprotection, de préférence choisi parmi un groupement photolabile, le
- 25 monométhoxytrityle, le diméthoxytrityle, le *tert*-butyldiméthylsilyle, l'acétyl et le trifluoroacétyl, et

- une étape de condensation, sur l'autre groupement hydroxyle laissé libre, d'un groupement phosphoré susceptible de réagir avec un groupement hydroxyle libre, de préférence choisi parmi les groupements phosphodiester, phosphoramidite et H-phosphonate ; et

- 5 (ii) lorsque Y est  $-(CH_2)_s-NH-$  et Z est  $-(CH_2)_t-COO-$  :

- une étape de protection du groupement  $NH_2$  d'un composé de formule générale

(III) :



- 10 dans laquelle

- Me est tel que défini précédemment,
- $Y''$  est  $-(CH_2)_s-$  et
- $Z''$  est  $-(CH_2)_t-$ ,
- s et t étant tels que définis précédemment,

- 15 par fixation d'un groupement susceptible de laisser une fonction amine libre après déprotection, de préférence choisi parmi le 9-fluorényloxycarbonyle, le *tert*-butoxycarbonyle et le benzyloxycarbonyle.

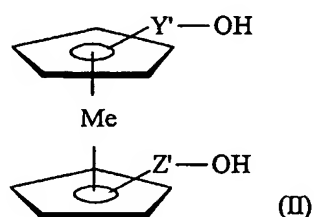
L'étape de protection d'un des groupements hydroxyle d'un composé de formule générale (II) par un groupement protecteur capable de laisser un groupement

20 hydroxyle libre après déprotection, tel qu'un groupement photolabile, le monométhoxytrityle, le diméthoxytrityle, le *tert*-butyldiméthylsilyle, l'acétyle et le trifluoroacétyle, est effectuée dans des conditions bien connues de l'homme du métier telles que décrites dans Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry (Volume 1), John Wiley & Sons, Inc., NY 1999.

- 25 De même, l'étape de condensation, sur l'autre groupement hydroxyle laissé libre du composé de formule (II), d'un groupement protecteur phosphoré tel qu'un groupement phosphodiester, phosphoramidite ou H-phosphonate est effectuée

dans des conditions bien connues de l'homme du métier telles que décrites dans Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry (Volume 1), John Wiley & Sons, Inc., NY 1999 et dans Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties, Ed. Sudhir Agrawal, Methods in Molecular Biology, Humana Presse, 1993.

- 5 Les composés de formule (II) particuliers définis ci-après sont de nouveaux composés qui constituent un autre objet de l'invention, ils sont choisis parmi les bis(hydroxy)métallocènes de formule générale (II) :



10

dans laquelle

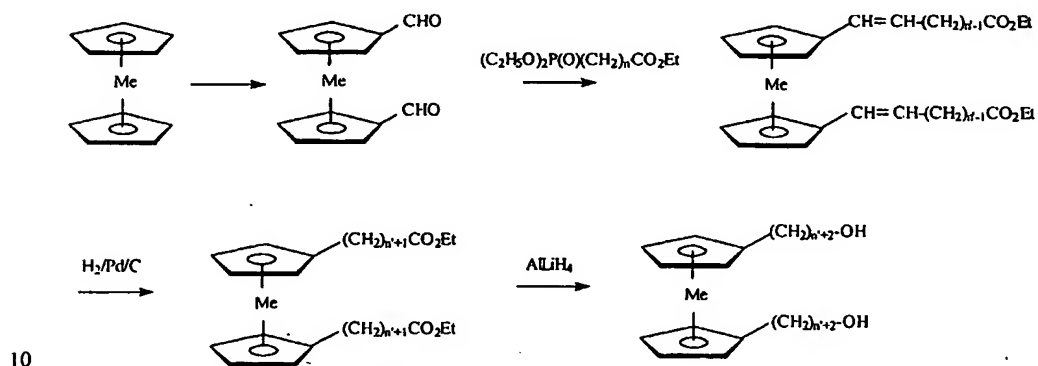
- Me est un métal de transition, de préférence choisi parmi Fe, Ru et Os,
- Y' et Z', identiques, sont choisis parmi  $-(CH_2)_n-$ ,  $-(CH_2)-O-[(CH_2)_2-O]_p-(CH_2)_2-$  et  $-(CH_2)_q-CONH-(CH_2)_r-$ ,
- 15 - n est un nombre entier compris entre 3 et 6,
- p' est un nombre entier compris entre 0 et 3,
- q est un nombre entier compris entre 0 et 2 et
- r est un nombre entier compris entre 0 et 2,
- étant entendu que lorsque Me est Fe ou Ru et que Y' et Z' sont  $-(CH_2)_n-$ , alors n est 5 et
- 20 lorsque Me est Fe et que Y' et Z' sont  $-(CH_2)-O-[(CH_2)_2-O]_p-(CH_2)_2-$ , alors p' est 0.

Selon un mode de réalisation préféré, les composés de formule (II) possèdent au moins l'une des caractéristiques suivantes :

- Me est le fer, et
- 25 - Y' et Z' sont chacun  $-(CH_2)_n-$ , n étant égal à 3 ou bien Y' et Z' sont chacun  $-(CH_2)-O-[(CH_2)_2-O]_p-(CH_2)_2-$ , p' étant égal à 0.

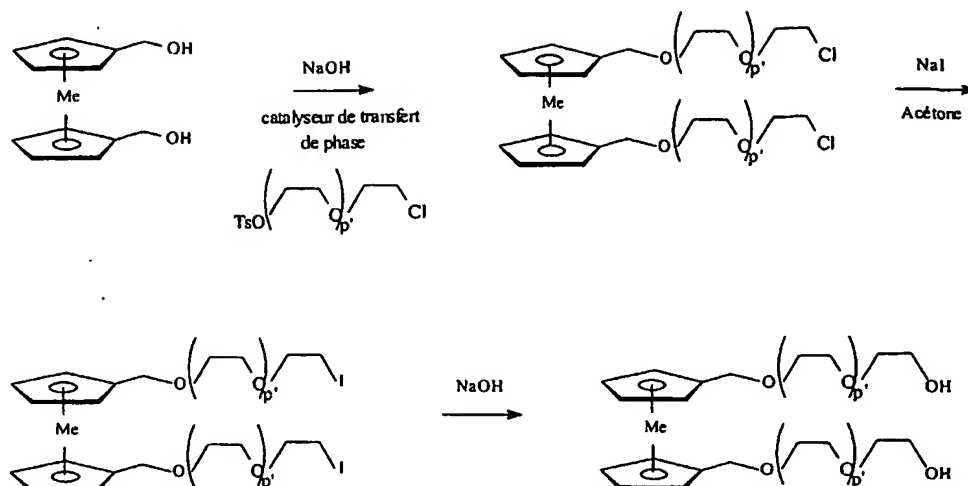
Les composés de formule (II) peuvent être obtenus de différentes façons selon la nature du bras espaceur Y' et Z'.

Pour obtenir un métallocène avec  $-(CH_2)_n-$  comme bras espaceurs, on greffe des fonctions aldéhyde sur un métallocène, puis on fait réagir le composé ainsi obtenu avec un diéthylphosphonoalkylate d'éthyle approprié pour obtenir un 1,1'-bis[(2-éthoxyoxycarbonyl)alcényl]métallocène, puis on effectue deux étapes de réduction pour réduire d'une part la double liaison, puis pour libérer l'alcool primaire, comme indiqué ci-dessous :



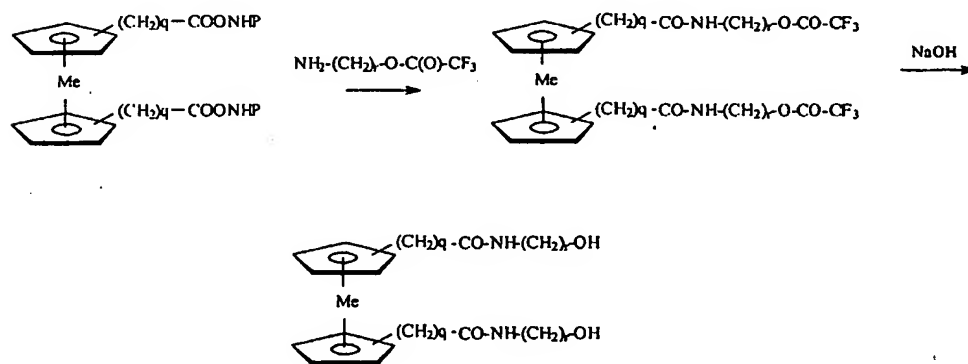
où Et est l'éthyle et n' est compris entre 2 et 4.

Pour obtenir un métallocène avec  $-(CH_2)-O-[(CH_2)_2-O]_{p-1}-(CH_2)_2-$  comme bras espaceurs, on fonctionnalise les groupements hydroxyle d'un bis-(hydroxyméthyl)métallocène en groupements 2-chloroéthyl(poly(oxyde d'éthylène)) appropriés en présence d'une base telle que NaOH, puis on convertit le radical chloro en iodo, puis en hydroxyle, comme indiqué ci-dessous :



où Ts est le tosyte et  $p'$  est un nombre entier compris entre 0 et 3.

5 Pour obtenir un métallocène avec  $-(CH_2)_q-CONH-(CH_2)_r-O-$  comme bras espaceurs, on traite un 1,1'-(N-hydroxyphthalimidecarbonylalkyl)métallocène approprié, tel qu'obtenu selon le mode opératoire décrit dans la demande WO01/81446, par de la trifluoroacétoxyalkylamine appropriée, puis on convertit le radical trifluoroacétoxy en hydroxyle comme indiqué ci-dessous :



10

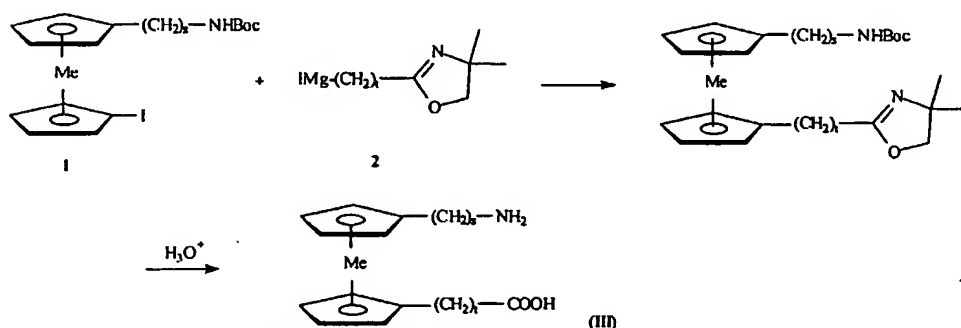
où  $q$  et  $r$  sont tels que définis précédemment



Le composé (III) peut être produit selon le mode opératoire suivant :

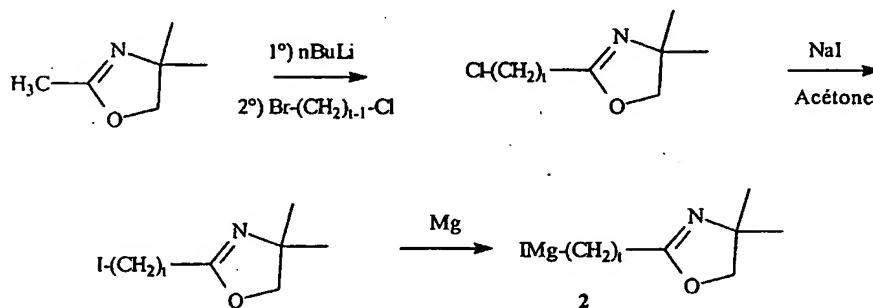
Un 1-*tert*-butoxycarbonylaminoalkyl-1'-iodométallocène approprié 1 est mis à réagir avec un iodure organométallique 2, puis, en fin de traitement, la fonction acide est libérée pour donner le composé (III), comme indiqué ci-dessous :

5



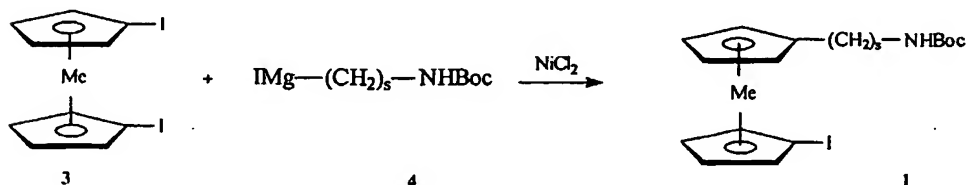
où  $s$  et  $t$  sont tels que décrits précédemment.

Le composé 2 peut lui-même être obtenu selon la synthèse suivante :



10

Le composé 1 peut être obtenu par réaction de 1,1'-iodométallocène 3 avec un iodure organométallique 4 comme suit :

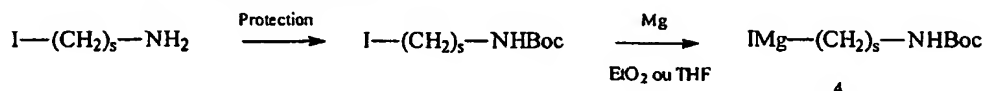


15 comme décrit dans :

a) « Comprehensive organic Synthesis », volume 3, Barry M. Trost and Ian Fleming

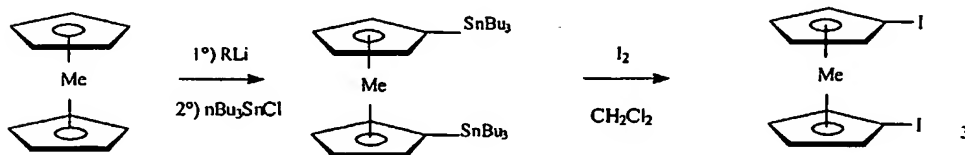
b) «Palladium Reagents and catalysts» Juio Tsuji Wiley & sons 1995

L'iodure organométallique 4 peut lui-même être obtenu à partir d'un iodure d'alkylamine en 2 étapes, comme suit :



où s est tel que décrit précédemment, comme décrit dans « Protective groups in Organic Chemistry » Greene – Wuts, Third edition, Wiley Interscience.

Enfin, le 1,1'-iodométallocène 3 peut lui-même être obtenu selon le mode opératoire suivant, comme décrit dans l'article D. Guillaneux, H. B. Kagan, J. Org. Chem. 1995, 60, 2502-2505.



Les métallocènes de formule (I) ainsi obtenus peuvent alors être utilisés pour le marquage, notamment de molécules biologiques d'intérêt telles que les oligonucléotides et les peptides au cours de leur synthèse supportée.

Ainsi, un autre objet de l'invention consiste en un procédé de marquage d'un oligonucléotide ou d'un peptide par un métallocène bifonctionnalisé de formule (I) de l'invention, lequel procédé comprend la substitution d'un ou plusieurs synthons de nucléosides ou d'acides aminés par un ou plusieurs desdits métallocènes de formule (I) dans le cycle de synthèse dudit oligonucléotide ou dudit peptide.

Dans le cas de la synthèse des oligonucléotides, on utilise un ou plusieurs métallocènes de formule (I), dans laquelle Y et Z, identiques, sont choisis parmi - $(\text{CH}_2)_n\text{-O-}$ , - $(\text{CH}_2)\text{-O-}[(\text{CH}_2)_2\text{-O}]_p\text{-}$  et - $(\text{CH}_2)_q\text{-CONH-}(\text{CH}_2)_r\text{-O-}$ .

Dans le cas de la synthèse des peptides, on utilise un ou plusieurs métallocènes de formule (I) dans laquelle Y est - $(\text{CH}_2)_s\text{-NH-}$  et Z est - $(\text{CH}_2)_t\text{-COO-}$ .

La substitution des synthons de nucléosides ou d'acides aminés par des métallocènes de l'invention peut être réalisée sur les synthétiseurs actuels à n'importe

quelle position de la chaîne. Selon un mode de réalisation de l'invention, la substitution remplit au moins l'une des conditions suivantes :

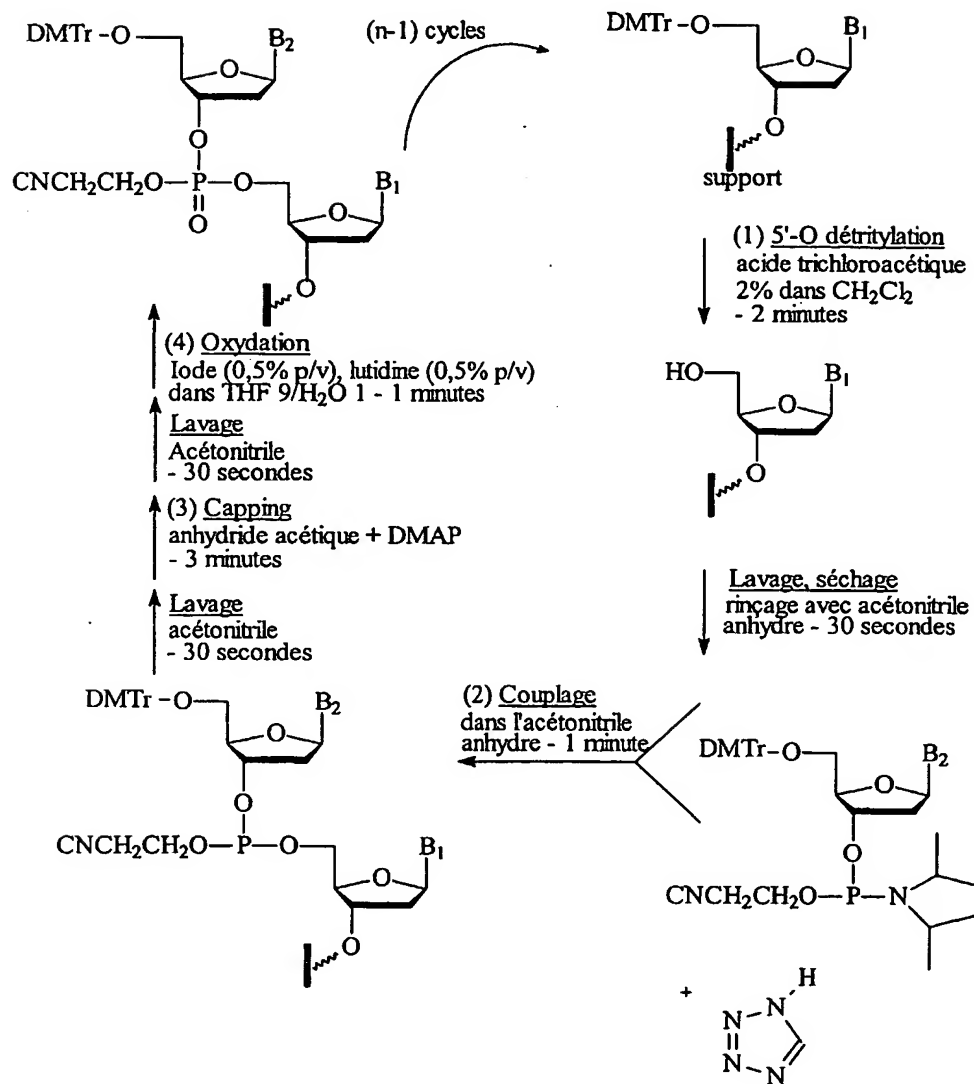
- elle est effectuée en positions 3' ou 5' dans le cas des oligonucléotides ou aux extrémités C-terminale ou N-terminale dans le cas des peptides et
- 5 - il y a au moins deux substitutions consécutives.

La substitution peut être mise en œuvre facilement par l'homme du métier car elle consiste uniquement à remplacer un nucléotide ou un acide aminé par un métallocène de l'invention.

- 10 Ainsi, par exemple, dans le cas du cycle de condensation phosphoramidite tel que représenté sur le schéma 1 ci-dessous, l'un quelconque des nucléotides de cette chaîne, ou plusieurs, peut ou peuvent être remplacé(s) par un ou plusieurs métallocènes de formule (I) dans laquelle l'un des groupements protecteurs R ou R' est un phosphoramidite.

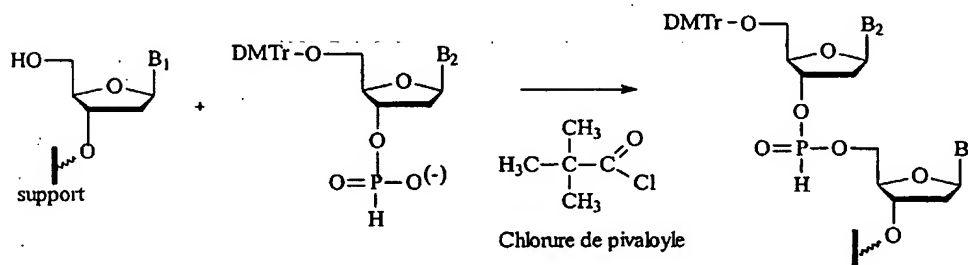
Schéma 1

## Cycle de condensation phosphoramidite



Selon un autre exemple, dans le cas du cycle en série « H-phosphonate » tel que représenté sur le schéma 2 ci-dessous, l'un quelconque des nucléotides de ce cycle, ou plusieurs, peut ou peuvent être remplacé(s) par un ou plusieurs métallocènes de formule (I) dans laquelle l'un des groupements protecteurs R ou R' est un H-phosphonate.

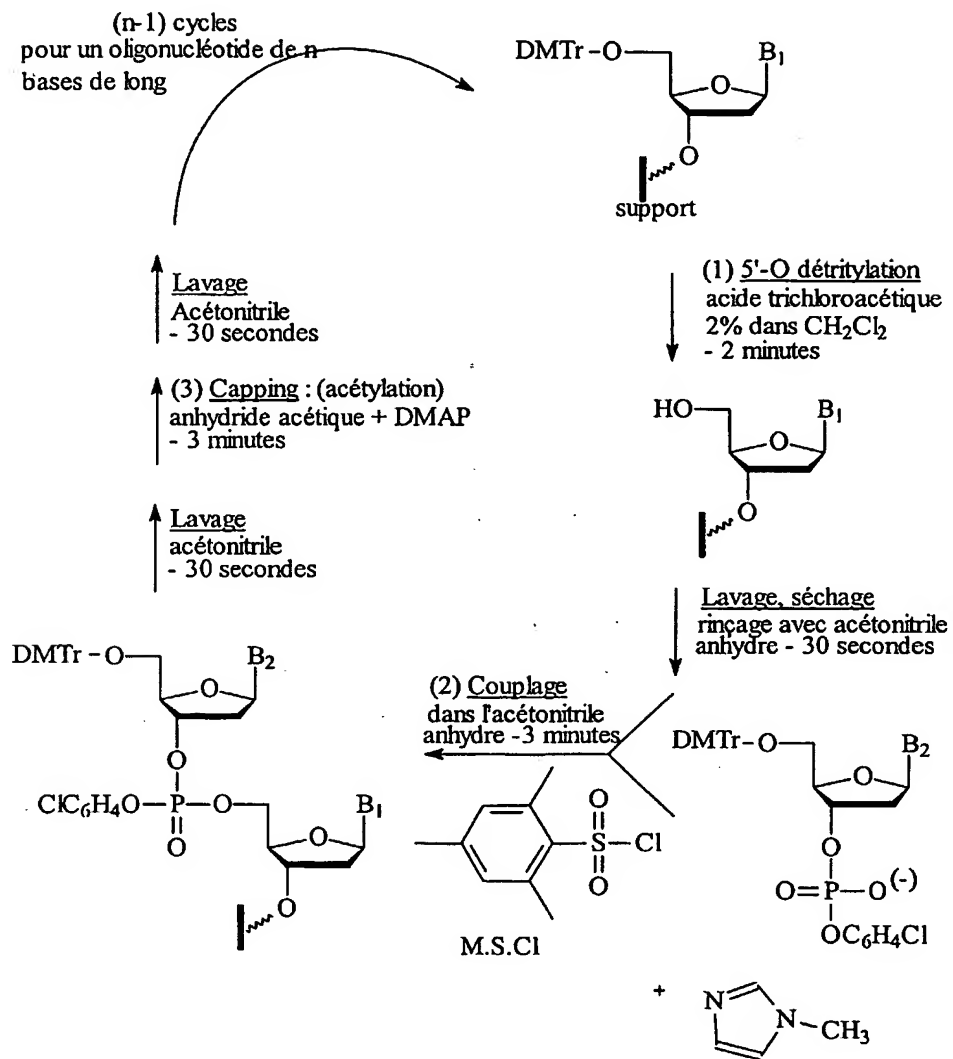
Schéma 2  
Cycle en série « H-phosphonate »



De même, selon un autre exemple, dans le cas du cycle de condensation « phosphotriester » tel que représenté sur le schéma 3 ci-dessous, l'un quelconque des nucléotides de ce cycle, ou plusieurs, peut ou peuvent être remplacé(s) par un ou plusieurs métallocènes de formule (I) dans laquelle l'un des groupements protecteurs R ou R' est un phosphodiester.

Schéma 3

## Cycle de condensation phosphotriester



De même, l'homme du métier pourra facilement remplacer un ou plusieurs acides aminés par un ou plusieurs métallocènes de l'invention au cours de synthèses de peptides connues, telles que la synthèse selon la chimie du BOC (*tert*-butoxycarbonyl) ou du FMOC (9-fluorényloxycarbonyl).

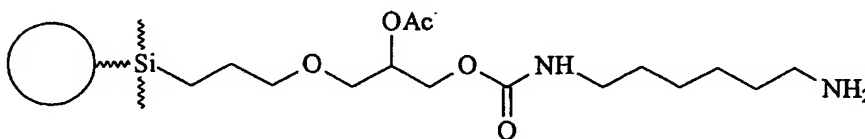
5 Les oligonucléotides et peptides tels que marqués par les métallocènes de l'invention sont nouveaux et constituent un autre objet de l'invention.

Comme précédemment, les oligonucléotides sont marqués avec un ou plusieurs métallocènes issus de métallocènes de formule (I), dans laquelle Y et Z, chacun indépendamment, sont choisis parmi  $-(CH_2)_n-O-$ ,  $-(CH_2)_2-O-[(CH_2)_2-O]_p-$  et  $-(CH_2)_q-CONH-(CH_2)_r-O-$ , et les peptides sont marqués avec un ou plusieurs métallocènes issus de métallocènes de formule (I) dans laquelle Y est  $-(CH_2)_s-NH-$  et Z est  $-(CH_2)_t-COO-$ . Les métallocènes de formule II de l'invention s'intègrent dans les séquences d'oligonucléotides de façon à remplacer, d'un point de vue chimique, les nucléosides dans lesdites séquences. De façon similaire les métallocènes de formule III s'intègrent dans les séquences des peptides de façon à remplacer, d'un point de vue chimique les acides aminés dans lesdites séquences.

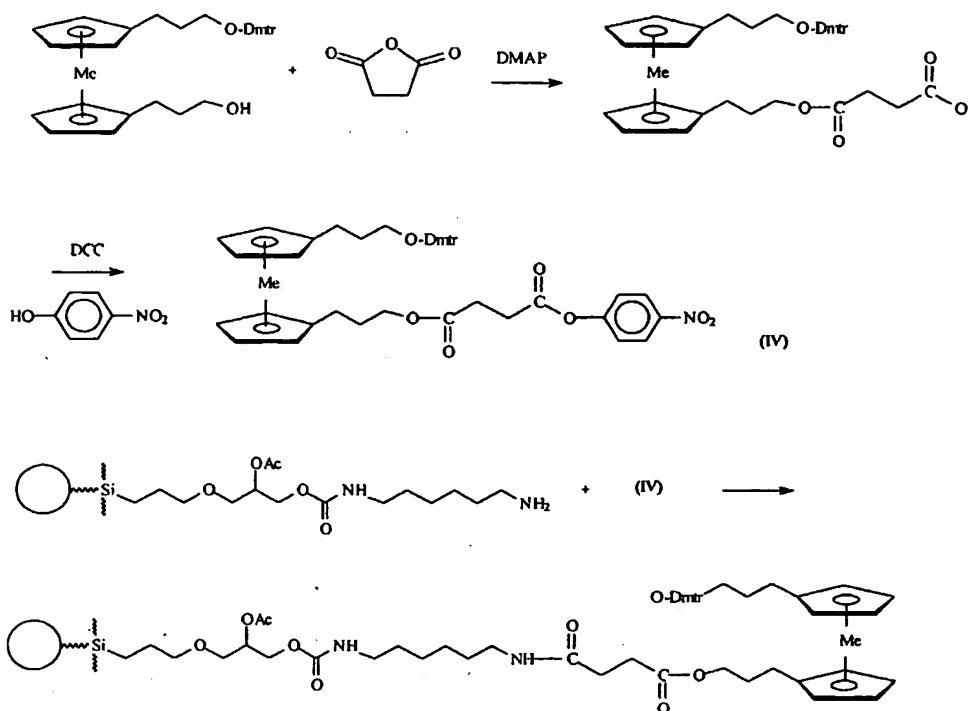
Selon un mode de réalisation préféré, les oligonucléotides ou peptides de l'invention comportent au moins un métallocène de l'invention en positions 3' ou 5', ou bien aux extrémités C-terminale ou N-terminale, respectivement.

20 Dans le cas où on vise à obtenir un oligonucléotide marqué en position 3', on peut utiliser un support solide sur lequel est greffé au moins un métallocène de l'invention, par réaction covalente de l'une de ses extrémités fonctionnalisées. Ce complexe support-métallocène(s) constitue un autre objet de l'invention.

A titre de support, on peut utiliser le support ci-dessous LCAA-CPG (Long Chain alkylamine controlled Pore Glass) qui est classiquement utilisé en synthèse oligonucléotidique.



Le greffage du ou des métallocènes de l'invention sur le support peut être effectué par exemple selon le mode opératoire suivant :



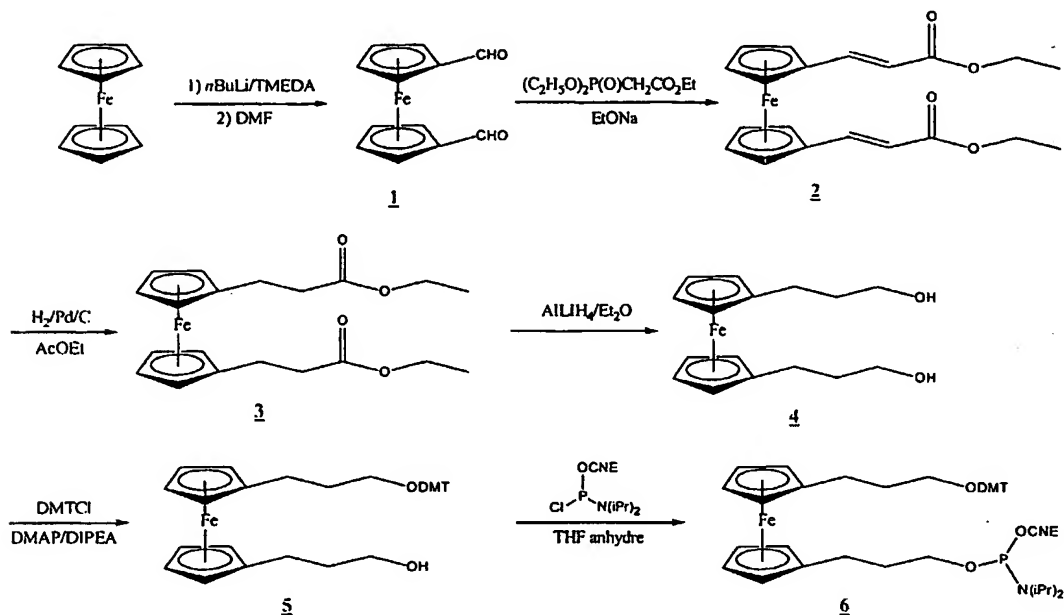
5

où Dmtr est le diméthoxytrityle, DMAP est la diméthylaminopyridine, DCC est le dicyclohexylcarbodiimide, comme décrit dans Matteucci & Caruthers, J. Am. Chem. Soc., 1981, 103, 3185-3191.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide des exemples suivants  
 10 qui font référence à la figure 1 annexée représentant le profil HPLC d'un oligonucléotide de l'invention présentant un ferrocène de l'invention en position 3', et qui sont donnés à titre illustratifs uniquement et non à titre limitatifs.



Exemple 1 : Synthèse du 1-[3-O-diméthoxytritylpropyl]-1'-[3'-O-(2-cyanoéthyl)-N,N-diisopropylphosphoramidite]propyl]ferrocène 6



5 1.1 Synthèse du 1,1'-bisformylferrocène 1

On a traité 1 g (5,37 mmol) de ferrocène dissous dans 12 mL d'éther éthylique anhydre par 7,2 mL (11,56 mmol) de  $n\text{BuLi}$  (solution 1,6 M dans l'hexane) et par ajout de 1,74 mL (11,56 mmol) de N, N, N', N'-tétraméthyléthylène diamine. On a laissé la réaction sous argon et sous agitation pendant 20 heures à température ambiante. On a ajouté 1,33 ml (17,20 mmol) de DMF à  $-78^\circ\text{C}$ . Après 2 heures d'agitation à  $-78^\circ\text{C}$ , on a hydrolysé le mélange réactionnel (15 mL d'eau). On a extrait la phase aqueuse au dichlorométhane ( $3 \times 15\text{ mL}$ ). On a séché la phase organique résultante sur  $\text{MgSO}_4$  puis on l'a concentré. On a purifié le résidu sur gel de silice avec un mélange pentane-acétate d'éthyle (50:50).

15 On a obtenu 0,62 g (2,56 mmol, 48%) du composé **1** sous la forme d'une pâte marron.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 4,62 (d,  $J = 9$  Hz, 4H,  $\text{H}_2\text{H}_3\text{-H}_2\text{H}_3$ ) ; 4,83 (d,  $J = 8,7$  Hz, 4H,  $\text{H}_1\text{H}_4\text{-H}_1\text{H}_4$ ) ; 9,89 (m, 2H, 2CHO).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 70,9 ( $\text{C}_2\text{C}_5$ ) ; 74,20 ( $\text{C}_3\text{C}_4$ ) ; 80,4 ( $\text{C}_1$ ) ; 192,9 ( $\text{C}_6$ ).

5 SM : 185 (60) ; 243 ( $\text{M}^{++}$ , 95).

### 1.2 Synthèse du 1,1'-bis[(2-éthoxyoxycarbonyl)éthényl]ferrocène 2

Dans un ballon tricol de 50 mL muni d'un réfrigérant et sous argon, on a introduit 0,094 g (4,08 mmol) de sodium et 25 mL d'éthanol absolu. Après  
10 consommation totale du sodium, on a refroidi la solution à 0°C, puis on a ajouté 0,809 mL (4,08 mmol) du diéthylphosphonoacétate d'éthyle et 0,470 g (1,94 mmol) de ferrocène 1,1'-carboxyaldéhyde 1 préalablement dissous dans 10 mL d'éthanol absolu.

Après retour à température ambiante et évaporation, on a purifié le résidu sur gel de silice avec un mélange cyclohexane-acétate d'éthyle (95 : 5).

15 On a obtenu 0,560 g (1,46 mmol, 75%) du composé 2 sous la forme de cristaux rouges.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 1,26 (t,  $J=7,15$  et  $J=7,12$  Hz, 6H,  $\text{H}_9\text{H}_{10}\text{H}_{11}\text{-H}_9\text{H}_{10}\text{H}_{11}$ ) ; 4,15 (q,  $J=7,14$  et  $J=7,11$  Hz, 4H,  $\text{H}_7\text{H}_8\text{-H}_7\text{H}_8$ ) ; 4,31 (m, 4H,  $\text{H}_2\text{H}_3\text{-H}_2\text{H}_3$ ) ; 4,38 (m, 4H,  $\text{H}_1\text{H}_4\text{-H}_1\text{H}_4$ ) ; 5,91 (d,  $J=15,80$  Hz, 2H,  $\text{H}_6\text{-H}_6$ ) ; 7,33 (d,  $J=15,79$  Hz, 2H,  $\text{H}_5\text{-H}_5$ ).

20 RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 14,2 ( $\text{C}_{10}$ ) ; 60,1 ( $\text{C}_9$ ) ; 69,7 ( $\text{C}_2\text{C}_5$ ) ; 72,2 ( $\text{C}_3\text{C}_4$ ) ; 79,9 ( $\text{C}_1$ ) ; 116,2 ( $\text{C}_7$ ) ; 143,7 ( $\text{C}_6$ ) ; 166,9 ( $\text{C}_8$ ).

SM : 382 ( $\text{M}^{++}$ , 85).

### 25 1.3 Synthèse du 1,1'-bis[(2-éthoxyoxycarbonyl)éthyl]ferrocène 3

Dans un ballon de 100 mL, on a introduit 0,400g (1,05 mmol) de composé 2, 0,100 g (0,94 mmol) de palladium sur charbon (Pd/C à 10%) et 40 mL d'acétate d'éthyle. La solution a soigneusement été dégazée par bullage d'un flux d'argon (environ 30 minutes). On a mis à buller de l'hydrogène contenu dans un ballon de

baudruche jusqu'à saturation de la solution. On a disposé un ballon de baudruche rempli d'hydrogène au dessus du montage. On a alors agité le mélange réactionnel vigoureusement pendant 48 à 72 heures.

Après filtration et concentration, on a obtenu 0,400 g (1,03 mmol, 99%) du composé 3 sous la forme d'une huile jaune.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 1,19 (t,  $J=7,15$  et  $J=7,12$  Hz, 6H,  $\text{H}_{11}\text{H}_{12}\text{H}_{13}-\text{H}_{11}\text{H}_{12}\text{H}_{13}$ ) ; 2,43 (m, 4H,  $\text{H}_7\text{H}_8-\text{H}_7\text{H}_8$ ) ; 2,57 (m, 4H,  $\text{H}_5\text{H}_6-\text{H}_5\text{H}_6$ ) ; 3,64 (s, 8H,  $\text{H}_1\text{H}_2\text{H}_3\text{H}_4-\text{H}_1\text{H}_2\text{H}_3\text{H}_4$ ) ; 4,06 (q,  $J=7,13$  et  $J=7,15$  Hz, 4H,  $\text{H}_9\text{H}_{10}-\text{H}_9\text{H}_{10}$ ).

10

#### 1.4 Synthèse du 1,1'-bis(3-hydroxypropyl)ferrocène 4

Dans un ballon tricol muni d'un réfrigérant, sous agitation et sous argon, on a introduit 0,140 g (3,70 mmol) d' $\text{AlLiH}_4$ . A l'aide d'une seringue, on a ajouté 7 mL d'éther éthylique anhydre. On a ajouté goutte à goutte 1,43 g (3,70 mmol) d'ester 3 dissous dans 9,5 mL d'éther éthylique anhydre de manière à maintenir un reflux constant. Le mélange a pris un aspect visqueux nécessitant l'addition de 15 mL de THF rigoureusement anhydre afin de faciliter la solubilisation des composés. On a contrôlé la réaction par CCM (élution : cyclohexane-acétate d'éthyle (80 : 20)). Au bout de 40 minutes d'agitation, on a décomposé l'excès de lithien par addition lente d'eau (15 mL) tout en maintenant l'agitation. On a observé la formation d'un précipité blanc de lithine. Après filtration, on a extrait la phase aqueuse à l'éther éthylique (2x25 mL). On a combiné les phases organiques, on les a séchées sur  $\text{MgSO}_4$  puis on les a concentrées.

On a recueilli 0,810 g (2,68 mmol, 72%) du composé 4 sous la forme d'une huile jaune.

25

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 1,54 (m, 4H,  $\text{H}_7\text{H}_8-\text{H}_7\text{H}_8$ ) ; 2,12 (t,  $J=7,81$  et  $J=7,08$  Hz, 4H,  $\text{H}_5\text{H}_6-\text{H}_5\text{H}_6$ ) ; 3,43 (t,  $J=6,12$  Hz,  $\text{H}_9\text{H}_{10}-\text{H}_9\text{H}_{10}$ ) ; 3,89 (m, 8H,  $\text{H}_1\text{H}_2\text{H}_3\text{H}_4-\text{H}_1\text{H}_2\text{H}_3\text{H}_4$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) : 25,7 ( $\text{C}_6$ ) ; 34,1 ( $\text{C}_7$ ) ; 62,3 ( $\text{C}_8$ ) ; 69,0 ( $\text{C}_2\text{C}_5$ ) ; 64,4 ( $\text{C}_3\text{C}_4$ ) ; 70,3 ( $\text{C}_1\text{C}_2\text{C}_3\text{C}_4\text{C}_5$ ) ; 89,1 ( $\text{C}_1$ ).

30

SM : 161 (21) ; 179 (40) ; 302 (M<sup>+</sup>, 100).

#### 1.5 Synthèse du 1-[3-O-diméthoxytritylpropyl]-1'-[3'-hydroxypropyl]ferrocène 5

Dans un ballon de 25 mL, on a introduit successivement 200 mg (0,662 mmol) de 1,1'-dihydroxypropylferrocène 4 et 16 mg (0,132 mmol) de DMAP. Après 2 coévaporations successives par 5 mL de pyridine anhydre, on a repris l'huile obtenue avec 5 mL de pyridine anhydre. On a ajouté 247 mg (0,728 mmol) de chlorure de 4,4'-diméthoxytrityle et 115 µL (0,662 mmol) de N,N-éthyl-diisopropylamine. On a laissé le mélange réactionnel sous agitation à température ambiante sous flux d'azote. On a suivi l'avancement de la réaction par CCM (élution : dichlorométhane-méthanol-TEA 89:10:1). Après élution, les plaques ont été systématiquement révélées dans un mélange éthanol-acide sulfurique. Après 4 heures d'agitation à température ambiante, on a ajouté 2 mL de méthanol au mélange réactionnel, afin de neutraliser le chlorure de 4,4'-diméthoxytrityle n'ayant pas réagi. Après concentration de moitié, on a repris le résidu au dichlorométhane (25 mL), on l'a lavé avec une solution aqueuse saturée en NaHCO<sub>3</sub>, puis à l'eau (5×25 mL). Après séchage sur MgSO<sub>4</sub> et concentration, on a fait coévaporer le brut par 2×10 mL de toluène, puis on a laissé sous vide toute une nuit. On a purifié le mélange sur gel de silice (préalablement neutralisé par de la TEA) avec des mélanges dichlorométhane-méthanol de polarité croissante.

On a isolé 304 mg (76%) du composé monotritylé 5. Ce dernier se présente sous la forme d'une huile orangée.

RMN <sup>1</sup>H (acétone D<sub>6</sub>) : 1,64-1,72 (m, 2H, H<sub>7</sub>-H<sub>8</sub>) ; 1,75-1,86 (m, 2H, H<sub>7</sub>H<sub>8</sub>) ; 2,38-2,53 (m, 4H, H<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-H<sub>5</sub>-H<sub>6</sub>) ; 3,08-3,14 (t, 2H, H<sub>9</sub>H<sub>10</sub>) ; 3,52-3,58 (t, 2H, H<sub>9</sub>-H<sub>10</sub>) ; 3,78, 3,79 (2s, 6H, -OCH<sub>3</sub>) ; 3,95-3,98 (m, 8H, H<sub>1</sub>H<sub>2</sub>H<sub>3</sub>H<sub>4</sub>-H<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>-H<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>) ; 6,82-7,68 (m, 13H, Ar).

#### 1.6 Synthèse du 1-[3-O-diméthoxytritylpropyl]-1'-[3'-O-(2-cyanoéthyl-N,N-diisopropylphosphoramidite)propyl]ferrocène 6

Dans un ballon de 25 mL, on a introduit successivement 255 mg (0,42 mmol) du composé ferrocène ODMT 5 et 7 mg (0,05 mmol) de DMAP. Après des coévaporations

successives par 2×2 mL de pyridine anhydre et 2×2 mL de THF anhydre, on a repris le résidu par 3 mL de THF anhydre. On a placé le mélange réactionnel sous flux d'azote, puis on a ajouté 147 µL (0,84 mmol) de N,N-éthyl-diisopropylamine en une seule fois. On a ajouté alors lentement à la seringue en verre 104 µL (0,46 mmol) de 2-cyanoéthyl-diisopropylchlorophosphoramidite (l'addition dure environ 10 minutes). Après la moitié de l'addition, on a observé la formation d'un précipité. Après 3h30 d'agitation à température ambiante, on a contrôlé la réaction par CCM (élution : pentane-acétate d'éthyle, 70:30). Le phosphoramidite formé étant très réactif, il ne subit pas le traitement classiquement utilisé. On a concentré le brut de moitié. La colonne de silice (assez courte) a été montée avec un mélange pentane-TEA (0,5%) pour neutraliser la silice, puis rincée au pentane pur. Après dépôt rapide du brut, le produit a été élué avec un mélange pentane-acétate d'éthyle (85:15) en poussant avec de l'argon pour accélérer la migration, afin de limiter au maximum le contact du produit avec la silice. Après concentration, on a obtenu 190 mg (56%) d'une huile. On a placé le produit sous vide pendant 12 heures puis on l'a conservé à -20°C.

Avant utilisation de ce produit pour la synthèse des ODN modifiés, il est préférable de vérifier la présence éventuelle de produits de dégradation par une RMN du phosphore et d'effectuer une purification rapide du produit si cela s'avère nécessaire.

RMN  $^{31}\text{P}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ) : 148,25 (P).

#### Exemple 2 : Synthèse d'un oligonucléotide 22mer 3'Fc-C7-NH<sub>2</sub> 7

La séquence de l'ODN 7 est :

3'NH<sub>2</sub>-C7-Fc-TGG AAT ACT CAG GTT CCT TAT G 5'

On a introduit 17 mg de support (2-diméthoxytrityloxyméthyl-6-fluorenylmethoxycarbonylamino-hexane-1-succinoyl)-long chain alkylamino-CPG 1000) fonctionnalisé à 59 µmol/g (Glen Research, Sterling US) dans une colonne de synthèse (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). On a mis en solution 100 mg de **6** (0.124 mmol) dans 1,24 mL d'acétonitrile anhydre (AB, France). On a utilisé la solution de **6** en position 5 d'un synthétiseur AB 394, suivant le même protocole opératoire que pour les phosphoramidites commerciaux (A, C, G, T). On a effectué la

synthèse de l'oligonucléotide 7 avec le programme standard 1 $\mu$ M dont l'étape de couplage des phosphoramidites a été modifiée comme suit : deux prélèvements de 3,5 s de la solution de phosphoramidite (au lieu d'un prélèvement comme dans le programme standard) intercalés par une pose de 15 s et suivis d'une pose de 25 s. Le rendement global de couplage par cycle a été de 97.5%. Après traitement de la CPG à l'ammoniaque aqueuse 30% (55°C pendant 16 h), on a concentré le surnageant au Speed Vac. On a repris le culot dans 1mL H<sub>2</sub>O et on a purifié 7 sur colonne préparative (Merck Lichrospher RP18E, 12 $\mu$ , 100Å, 300x7.5).

On a concentré les fractions au rotavapor puis on les a coévaporées 4 fois par H<sub>2</sub>O avant lyophilisation dans un eppendorf. On a obtenu 15 DO (unités d'absorbance à 260 nm) de produit pur.

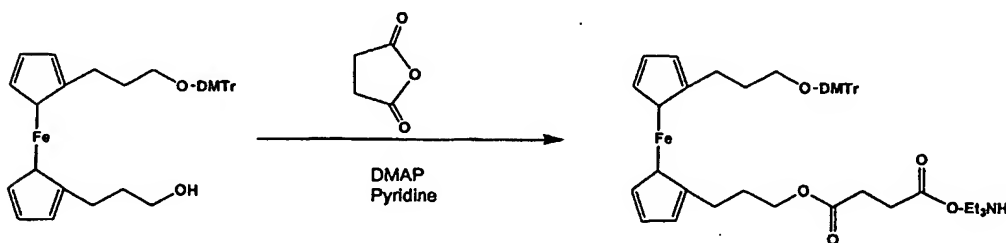
La pureté du produit a été vérifiée par analyse HPLC effectuée sur une colonne Waters Deltapak C<sub>18</sub> 5 $\mu$  300Å (3,9x150 mm). La figure 1 donne le chromatogramme obtenu à 260 nm.

15

Spectrométrie de masse (MALDI-TOF), Voyager DE (Perseptive Biosystem) :  
masse théorique m/z : 7352.9 , masse observée m/z : 7338.3.

### Exemple 3 : préparation d'un support pour la synthèse d'oligonucléotides

#### 20 3.1 Synthèse du sel de triéthylammonium du 1-[3-O-(p,p'-diméthoxytrityl)propyl]-1'-[3'-O-(succinate)propyl]ferrocène 8



25

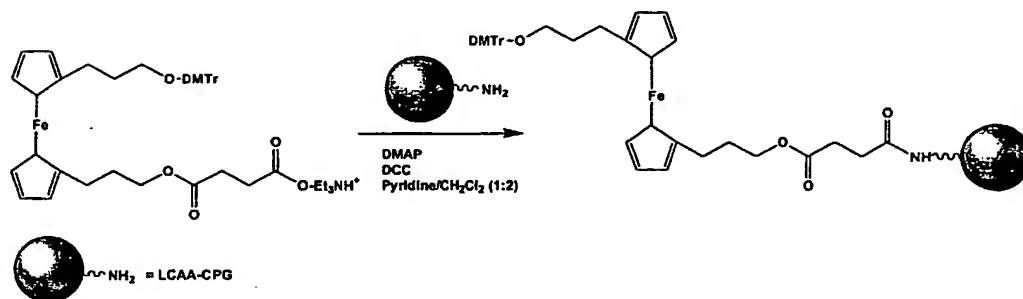
On a agité 149 mg (247  $\mu$ mol, 1 eq.) de 1-[3-O-(p,p'-diméthoxytrityl)propyl]-1'-[3'-hydroxypropyl]ferrocène 5,67 mg (667  $\mu$ mol, 2,7 eq.) d'anhydride succinique et

7 mg (25  $\mu$ mol, 0,1 eq.) de 4-*N,N*-diméthylaminopyridine (DMAP), avec 180mL (1,3 mmol, 5,3 eq.) de triéthylamine dans 2 mL de dichlorométhane anhydre sous atmosphère inerte. Au bout de 3h, le mélange réactionnel a été partitionné entre du bicarbonate de sodium aqueux (3 X 10mL) et du dichlorométhane (40 mL). On a séché  
 5 les phases organiques sur du sulfate de sodium, on les a filtrées et fait évaporer et purifiées sur colonne de gel de silice (gradient de MeOH dans CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) pour donner 160 mg (198  $\mu$ mol, 80 %) de produit désiré.

R<sub>f</sub> (2% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = 0,8

10 RMN <sup>1</sup>H :  $\delta$ ppm (CDCl<sub>3</sub>) = 7,34 (m, 9H, DMTr) ; 6,82 (m, 4H, DMTr) ; 4,12 (t, 2H, J=6,36 Hz, -CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>2</sub>-) ; 3,96 (m, 8H, ferrocène) ; 3,79 (s, 6H, 2XOCH<sub>3</sub>) ; 3,08 (m, 8H, -CH<sub>2</sub>-O-DMTr) ; 2,64 (m, 4H, O-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COO<sup>-</sup>) ; 2,42 (m, 4H, 2XCH<sub>2</sub>-Ferrocène) ; 1,82 (m, 4H, 2X-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-).

15 3.2 Fixation sur un support de type LCAA-CPG (Long Chain Alkyl Amin- Controled Pore Glass)



20

On a mis sous agitation mécanique dans 3 mL d'un mélange pyridine/dichlorométhane (1 : 2), pendant 48 h, 40,3 mg (50  $\mu$ mol) du sel de triéthylammonium du 1-[(*p,p'*-diméthoxytryl)propanol]-1'-(propanol succinate) ferrocène obtenu ci-dessus, 500 mg du support LCAA-CPG (500 Å), 600mg (3 mmol)  
 25 de dicyclohexylcarbodiimide (DCC), 40 mg (0,32 mmol) de diméthylaminopyridine

(DMAP) et 210  $\mu\text{L}$  (1,5 mmol) de triéthylamine. On a ensuite filtré les billes de silice et on les a lavées successivement avec de la pyridine, du dichlorométhane, du méthanol, du dichlorométhane et de l'éther (50 mL de chaque).

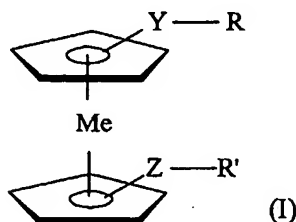
On a ensuite masqué les fonctions  $\text{NH}_2$  résiduelles en faisant réagir 1 mL  
5 d'anhydride acétique en présence de 1 mL de pyridine et de 20 mg de DMAP sur les billes de CPG pendant 2 h. On a ensuite filtré les billes et on les a rincées successivement avec du dichlorométhane, du méthanol, du dichlorométhane et de l'éther (25 mL de chaque). On les a séchées sous vide poussé jusqu'à ce que l'échantillon atteigne un poids constant.

10 On a estimé la fonctionnalisation du support en dosant le cation diméthoxytrityle relargué après avoir soumis un aliquote de support à un traitement acide. On a obtenu une fonctionnalisation de 0,1  $\mu\text{mol/mg}$ .



## REVENDICATIONS

## 1. Métallocène bifonctionnalisé de formule générale (I) :



5

dans laquelle

- Me représente un métal de transition, de préférence choisi parmi Fe, Ru et Os,
- Y et Z, identiques, sont choisis parmi  $-(CH_2)_n-O-$ ,  $-(CH_2)-O-[(CH_2)_2-O]_p-$  et  $-(CH_2)_q-CONH-(CH_2)_r-O-$ , ou bien
- 10 - Y est  $-(CH_2)_s-NH-$  et Z est  $-(CH_2)_t-COO-$ ,
- n est un nombre entier compris entre 3 et 6,
- p est un nombre entier compris entre 1 et 4,
- q est un nombre entier compris entre 0 et 2
- r est un nombre entier compris entre 0 et 2,
- 15 - s est un nombre entier compris entre 2 et 5,
- t est un nombre entier compris entre 3 et 6,
- R et R' représentent des atomes d'hydrogène ou sont des groupements protecteurs utilisés dans la synthèse des oligonucléotides et des peptides, étant entendu que l'un au moins de R ou R' est un groupement protecteur utilisé dans la synthèse des
- 20 oligonucléotides et des peptides et que R et R' sont tels que définis ci-après :
  - (i) lorsque Z et Y sont choisis parmi  $-(CH_2)_n-O-$ ,  $-(CH_2)-O-[(CH_2)_2-O]_p-$  et  $-(CH_2)_q-CONH-(CH_2)_r-O-$ , alors R et R' sont des groupements protecteurs utilisés dans la synthèse des oligonucléotides, et R est un groupement susceptible de laisser un groupement hydroxyle libre après déprotection, de préférence un groupement
  - 25 photolabile, le monométhoxytrityle, le diméthoxytrityle, le *tert*-butyldiméthylsilyle, l'acétyle ou le trifluoroacétyle, et R' est un groupement phosphoré susceptible de réagir

avec un groupement hydroxyle libre, de préférence un groupement phosphodiester, phosphoramidite ou H-phosphonate et

- (ii) lorsque Y est  $-(CH_2)_s-NH-$  et Z est  $-(CH_2)_t-COO-$ , alors R est un groupement protecteur utilisé dans la synthèse des peptides et représente un groupement protecteur des amines, de préférence le 9-fluorényloxycarbonyl, le *tert*-butoxycarbonyl ou le benzyloxycarbonyl, et R' représente un atome d'hydrogène.

2. Métallocène selon la revendication 1, caractérisé en ce que Me est le fer.

- 10 3. Métallocène selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que Y et Z sont choisis parmi  $-(CH_2)_n-O-$ ,  $-(CH_2)-O-[(CH_2)_2-O]_p-$  et  $-(CH_2)_q-CONH-(CH_2)_r-O-$ .

4. Métallocène selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que Y et Z sont chacun  $-(CH_2)_n-O-$ , n étant égal à 3.

15

5. Métallocène selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que Y et Z sont chacun  $-(CH_2)-O-[(CH_2)_2-O]_p-$ , p étant égal à 2.

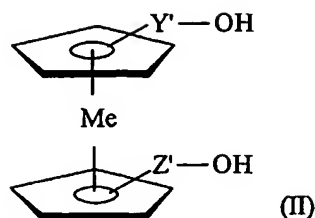
- 20 6. Métallocène selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que Y est  $-(CH_2)_s-NH-$ , Z est  $-(CH_2)_t-COO-$ .

7. Métallocène selon la revendication 6, caractérisé en ce que s est égal à 3 et t est égal à 4.

- 25 8. Procédé de préparation d'un métallocène de formule (I) selon l'une quelconque des revendications 3 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- une étape de protection d'un des groupements hydroxyle d'un composé de formule générale (II) :

30



dans laquelle Me est tel que défini dans les revendications précédentes,

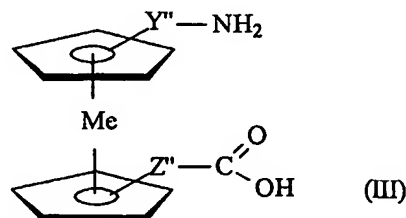
Y' et Z', identiques, sont choisis parmi  $-(CH_2)_n-$ ,  $-(CH_2)-O-[(CH_2)_2-O]_{p'}-(CH_2)_2-$  et  $-(CH_2)_q-CONH-(CH_2)_r-$ , n, q et r sont tels que définis dans les revendications précédentes, et p' est un nombre entier compris entre 0 et 3, par fixation d'un groupement susceptible de laisser un groupement hydroxyle libre après déprotection, de préférence choisi parmi un groupement photolabile, le monométhoxytrityle, le diméthoxytrityle, le *tert*-butyldiméthylsilyle, l'acétyle et le trifluoroacétyle, et

- une étape de condensation, sur l'autre groupement hydroxyle laissé libre, d'un groupement phosphoré susceptible de réagir avec un groupement hydroxyle libre, de préférence choisi parmi les groupements phosphodiester, phosphoramidite et H-phosphonate.

15

9. Procédé de préparation d'un métallocène de formule (I) selon l'une des revendications 6 ou 7, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- une étape de protection du groupement  $NH_2$  d'un composé de formule générale (III) :



20

dans laquelle

- Me est tel que défini précédemment,

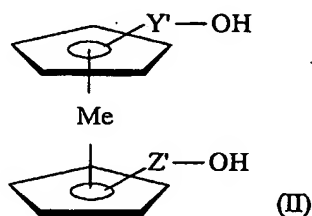
- Y'' est  $-(CH_2)_s-$  et

- Z'' est  $-(CH_2)_t-$ ,

- s et t étant tels que définis précédemment,

par fixation d'un groupement susceptible de laisser une fonction amine libre après déprotection, de préférence choisi parmi le 9-fluorényloxycarbonyle, le *tert*-butoxycarbonyle et le benzyloxycarbonyle.

10. Bis(hydroxy)métallocène de formule générale (II) :



dans laquelle

- Me est un métal de transition, de préférence choisi parmi Fe, Ru et Os,

Y' et Z', identiques, sont choisis parmi  $-(CH_2)_n-$ ,  $-(CH_2)-O-[(CH_2)_2-O]_p-(CH_2)_2-$  et  $-(CH_2)_q-CONH-(CH_2)_r-$ ,

- n est un nombre entier compris entre 3 et 6,

- p' est un nombre entier compris entre 0 et 3,

- q est un nombre entier compris entre 0 et 2 et

- r est un nombre entier compris entre 0 et 2,

étant entendu que lorsque Me est Fe ou Ru et que Y' et Z' sont  $-(CH_2)_n-$ , alors n est 5 et

lorsque Me est Fe et que Y' et Z' sont  $-(CH_2)-O-[(CH_2)_2-O]_p-(CH_2)_2-$ , alors p' est 0.

11. Bis(hydroxy)métallocène selon la revendication 10, caractérisé en ce que Me est le fer.

12. Bis(hydroxy)métallocène selon la revendication 10, caractérisé en ce que Y' et Z' sont chacun  $-(CH_2)_n-$ , n étant égal à 3.

13. Bis(hydroxy)métallocène selon l'une des revendications 10 ou 11, caractérisé en ce que Y' et Z' sont chacun  $-(CH_2)-O-[(CH_2)_2-O]_p-(CH_2)_2-$ , p' étant égal à 0.

5

14. Procédé de marquage d'un oligonucléotide par un métallocène bifonctionnalisé de formule (I) selon l'une quelconque des revendications 3 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend la substitution d'un ou plusieurs synthons de nucléotides par un ou plusieurs desdits métallocènes de formule (I) dans laquelle R et  
10 R' sont des groupements protecteurs utilisés dans la synthèse des oligonucléotides, dans le cycle de synthèse dudit oligonucléotide.

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que la substitution est effectuée en positions 3' ou 5' en remplacement du ou des premiers ou derniers nucléotides, respectivement.

16. Procédé de marquage d'un peptide par un métallocène bifonctionnalisé de formule (I) selon l'une des revendications 6 ou 7, caractérisé en ce qu'il comprend la substitution d'un ou plusieurs synthons d'acides aminés par un ou plusieurs desdits  
20 métallocènes de formule (I) dans laquelle R représente un groupement protecteur des amines et R' représente un atome d'hydrogène, dans le cycle de synthèse dudit peptide.

17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que la substitution est effectuée aux extrémités C-terminale ou N-terminale en remplacement des premiers ou  
25 derniers acides aminés, respectivement.

18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 17, caractérisé en ce qu'au moins deux substitutions consécutives sont effectuées.

30 19. Oligonucléotides marqués caractérisés en ce qu'ils sont susceptibles d'être obtenus par le procédé de marquage selon l'une des revendications 14 ou 15.

20. Oligonucléotides marqués caractérisés en ce qu'au moins l'un des nucléosides le constituant est substitué par un bis(hydroxy)métallocène de formule générale (II) selon l'une des revendications 10 à 13.

5

21. Oligonucléotides marqués selon l'une des revendications 19 ou 20, caractérisés en ce qu'ils comportent au moins bis(hydroxy)métallocène de formule générale (II) en position 3' ou 5'.

10 22. Peptides marqués caractérisés en ce qu'ils sont susceptibles d'être obtenus par le procédé selon l'une quelconque des revendications 16 à 18.

23. Peptides marqués caractérisés en ce que au moins l'un des peptides les constituant est substitué par un métallocène bifonctionnalisé de formule (III) tel que  
15 défini dans la revendication 9.

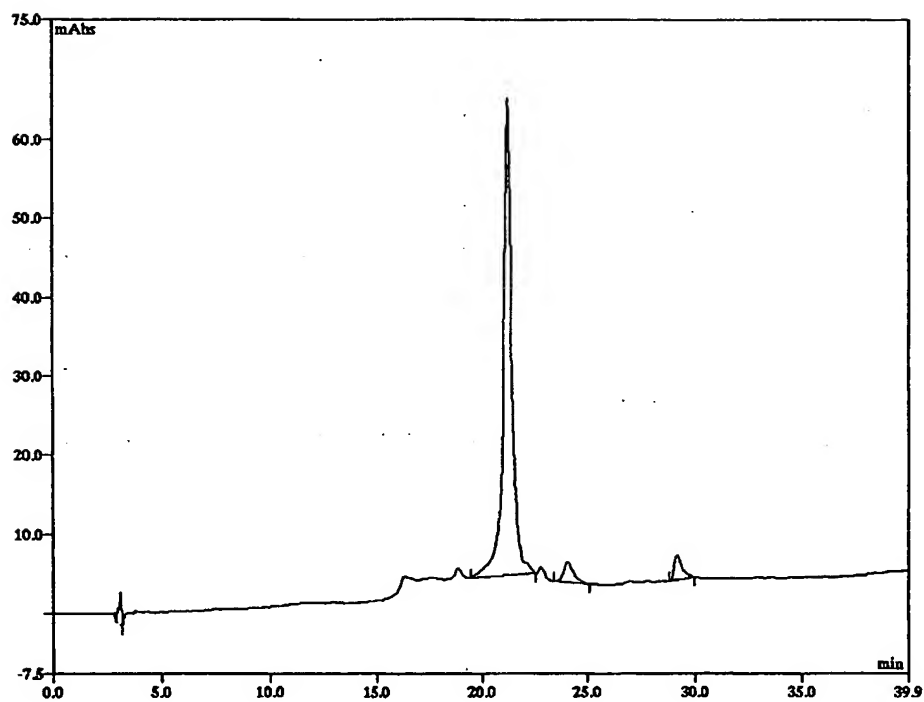
24. Peptides selon l'une des revendications 22 ou 23, caractérisés en ce qu'ils comportent au moins un métallocène bifonctionnalisé de formule (III) aux extrémités C-terminale ou N-terminale.

20

25. Support de synthèse d'oligonucléotides, caractérisé en ce que au moins un métallocène de formule (I) selon l'une des revendications 1 à 7 est greffé sur ledit support par réaction covalente de l'une des ses extrémités fonctionnalisées.

25

FIGURE 1



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/FR 03/00484

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C07F17/02 C07F17/00 C07K2/00 C07H23/00 C12Q1/68 G01N33/52		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07F C07H C07K C12Q G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) CHEM ABS Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; FAN, RUI-LAN ET AL: "Synthesis and characterization of rare earth metal complexes of 1,1'-ferrocenediacetyl hydroxylamine" retrieved from STN Database accession no. 137:149219 CA XP002216436 abstract & NEIMENGGU DAXUE XUEBAO, ZIRAN KEXUEBAN (2002), 33(1), 53-56, 2002,	1-7
X	WO 00 052063 A (LG CHEMICAL LTD., S. KOREA) 8 September 2000 (2000-09-08) the whole document	10-13
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the international filing date 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. 'Z' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 July 2003		Date of mailing of the international search report 25/07/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Rinkel, L



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 03/00484

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LINDNER, EKKEHARD ET AL: "Synthesis, Structure, and Electrochemistry of Osmametallophenes with Different Ring Size" ORGANOMETALLICS (1999), 18(4), 480-489, 1999, XP002216435 the whole document ---	10-13
X	LINDNER, E. ET AL: "Preparation, properties, and reactions of metal-containing heterocycles Part CV. Synthesis and structure of polyoxadiphosphaplatinaferrocenophane" JOURNAL OF ORGANOMETALLIC CHEMISTRY (2001), 630(2), 266-274, 2001, XP004297595 the whole document -----	1-7

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/FR 03/00484

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 00052063	A	08-09-2000	KR 2000062706 A 25-10-2000
		AU 2946400 A 21-09-2000	
		CA 2364011 A1 08-09-2000	
		CN 1370183 T 18-09-2002	
		EP 1214357 A1 19-06-2002	
		JP 2002538237 A 12-11-2002	
		WO 0052063 A1 08-09-2000	
		US 6506919 B1 14-01-2003	
-----			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°  
PCT/FR 03/00484

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 7 C07F17/02 C07F17/00 C07K2/00 C07H23/00 C12Q1/68 G01N33/52		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C07F C07H C07K C12Q G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) CHEM ABS Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DATABASE CA 'en ligne! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; FAN, RUI-LAN ET AL: "Synthesis and characterization of rare earth metal complexes of 1,1'-ferrocenediacetyl hydroxylamine" retrieved from STN Database accession no. 137:149219 CA XP002216436 abrégé & NEIMENGGU DAXUE XUEBAO, ZIRAN KEXUEBAN (2002), 33(1), 53-56, 2002,	1-7
X	WO 00 052063 A (LG CHEMICAL LTD., S. KOREA) 8 septembre 2000 (2000-09-08) le document en entier	10-13
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *G* document qui fait partie de la même famille de brevets	
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
15 juillet 2003	25/07/2003	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé	
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Rinkel, L	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 03/00484

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	LINDNER, EKKEHARD ET AL: "Synthesis, Structure, and Electrochemistry of Osmametallophenes with Different Ring Size" ORGANOMETALLICS (1999), 18(4), 480-489, 1999, XP002216435 le document en entier ---	10-13
X	LINDNER, E. ET AL: "Preparation, properties, and reactions of metal-containing heterocycles Part CV. Synthesis and structure of polyoxadiphosphaplatinaferrocenophane" JOURNAL OF ORGANOMETALLIC CHEMISTRY (2001), 630(2), 266-274, 2001, XP004297595 le document en entier -----	1-7

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No.  
PCT/FR 03/00484

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 00052063 A	08-09-2000	KR 2000062706 A	25-10-2000
		AU 2946400 A	21-09-2000
		CA 2364011 A1	08-09-2000
		CN 1370183 T	18-09-2002
		EP 1214357 A1	19-06-2002
		JP 2002538237 A	12-11-2002
		WO 0052063 A1	08-09-2000
		US 6506919 B1	14-01-2003
-----			

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**